

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 01-230365

(43)Date of publication of application : 13.09.1989

(51)Int.Cl.

A61L 27/00

(21)Application number : 63-053836

(71)Applicant : TERUMO CORP

(22)Date of filing : 09.03.1988

(72)Inventor : YOSHIZATO KATSUTOSHI

KOIDE MIKIO

KONISHI ATSUSHI

OYAMADA KO

OSAKI KENICHI

KATAKURA TAKEO

MORI YUICHI

## (54) CELL AGGRESSIVE MEDICAL MATERIAL AND ITS MANUFACTURE

## (57)Abstract:

PURPOSE: To maintain necessary mechanical strength for a specified period of time as well as to allow propagated cells to come inside with ease with affinity for cells and tissues maintained excellent by letting collagen with cross-linking structure be composed of denatured collagen processed with heat under the presence of water.

CONSTITUTION: Denatured collagen can be obtained in such a way that collagen derived from true cow skin is oxidized or alkalinized so as to let obtained collagen including triple chain helices be processed with heat or with cross-linking agent applied for letting the processed one be heated upto 50 to 125° C under the presence of water thereafter. As raw collagen, oxidized or alkalinized one with no antigen property is preferable wherein telopeptide at its molecular end is digested so as to be removed by use of proctase or pepsine. The cross-linking of collagen is preferably processed in such a way that it is kept at 110° C under vacuum for the period of time equal to or more than 24 hours so as to be dehydrated when it is processed by cross lining treatment. And cross-linking agent in an aldehyde family such as glutaric aldehyde and the like is used at the time of processing by use of cross-linking agent.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平1-230365

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>  
A 61 L 27/00

識別記号 庁内整理番号  
C-6971-4C  
Q-6971-4C

⑭ 公開 平成1年(1989)9月13日

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全4頁)

⑮ 発明の名称 細胞侵入性医用材料およびその製造法

⑯ 特 願 昭63-53836

⑰ 出 願 昭63(1988)3月9日

⑱ 発 明 者	吉 里	勝 利	神奈川県海老名市大谷40-1-518
⑱ 発 明 者	小 出	幹 夫	静岡県富士市大淵2626番地の1 テルモ株式会社内
⑱ 発 明 者	小 西	淳	静岡県富士市大淵2626番地の1 テルモ株式会社内
⑱ 発 明 者	小 山	田 香	静岡県富士市大淵2626番地の1 テルモ株式会社内
⑱ 発 明 者	大 崎	健 一	静岡県富士市大淵2626番地の1 テルモ株式会社内
⑱ 発 明 者	片 倉	健 男	静岡県富士市大淵2626番地の1 テルモ株式会社内
⑱ 発 明 者	森	有 一	静岡県富士市大淵2626番地の1 テルモ株式会社内
⑲ 出 願 人	テ ル モ 株 式 会 社		東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号
⑳ 代 理 人	弁 理 士 高 木 千 嘉		外2名

目 次

1. 発明の名称 細胞侵入性医用材料およびその製造法
2. 特許請求の範囲
  - 1) 架橋構造を有するコラーゲンを水の存在下で加熱処理した変性コラーゲンからなる細胞侵入性医用材料。
  - 2) コラーゲンが線維化コラーゲンである請求項1の医用材料。
  - 3) 線維化コラーゲンが線維化アテロコラーゲンである請求項2の医用材料。
  - 4) コラーゲンを加熱処理または架橋剤で処理して架橋構造を有するコラーゲンを調製し、次いでこれを水の存在下で50~125℃で加熱することを特徴とする請求項1の細胞侵入性医用材料の製造法。
3. 発明の詳細な説明  
〔産業上の利用分野〕  
本発明は細胞侵入性医用材料およびその製造法

に関する。

さらに詳しくは本発明は架橋構造を有するコラーゲンを水の存在下で加熱処理した変性コラーゲンからなる細胞侵入性医用材料およびその製造法に関する。

本発明の医用材料は生体内に埋入されて生体組織と同化され、あるいは創傷面に被覆されて真皮組織に変換されるので医学および生物学の分野において人工皮膚、人工血管等として利用される。

〔従 来 の 技 術〕

生体組織に何らかの異常が生じた場合、自己の他部位の組織あるいは、親族など免疫原性の少ない個体からの同種移植が好ましいがそのような供給が困難な場合には人工物をもってそれに代替するという発想は古くから存在した。しかし、当然免疫拒絶反応の対象となるケースが多く、そのため組織や免疫系細胞から不感作であるような、いわゆる組織反応が低い物質を求める努力が続けられている。ポリウレタンを代表とする合成高分子を、より疎水化させる方向の研究などはその一例

## 特開平 1-230365(2)

である。また、これとは全く正反対に、免疫反応を引き起こす前に速かに物質が組織と同化してしまうことにより器官としての機能を付与するという考え方がある。人工物としては生体由来材料であるコラーゲン等を選択し、線維芽細胞等組織修復機能を持った細胞を早期に侵入させて、結合組織様の組織を構築させて目的の組織をおおむね免疫反応を免れる考え方、後者の方がより理想に近い形である。

〔発明が解決しようとする問題点〕

コラーゲンをを用いた人工材料は生体由来であるため、確かに細胞組織に対する親和性は大きいと考えられるものの、生体内でコラーゲナーゼにより容易に分解・吸収されるものである。そこで使用するにあっては、何らかの手段で架橋を導入し、物性面の強化をはかる必要がある。架橋法としては加熱による脱水架橋、薬品を用いる化学的架橋等を採用し得る。このうち、熱脱水架橋は薬品処理に比べ安全性が高いが、物性的にコラーゲナーゼ酵素に対する耐性が化学的架橋に対して低い。そ

こで、化学的架橋を熱架橋と併用させたり、化学的架橋単独で用いる手段が選択される。これを実施すると、物性面での性質向上が著しい。例えば、110℃の温度で真空中に24時間置いて熱的な架橋を導入した場合には、コラーゲナーゼ 3 unit/ml 中に37℃下で静置すると1日以内に溶解するのに対し、イソシアネート系架橋のみを施した場合にはコラーゲナーゼ 100 unit/ml 中に37℃で7日経過しても形態に変化が見られない。ところが、かかる強固な架橋を導入すると、導入前にコラーゲンが有していた細胞、組織に対する親和性が大幅に低下し、細胞侵入が阻止される傾向が出現する。つまり物性面の強化と、細胞、組織に対する親和性という生物学的性能の向上とは、両立が困難な相反する事象であり、満足する材料は従来求め得なかった。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明の目的は、生体に埋入または創傷面に被覆した際に生体内の分解酵素に対して抵抗性を有し、一定期間必要な機械的強度を保持し、かつ細

— 3 —

胞、組織に対する親和性が良好で増殖した細胞が容易にその内部に入り込みやすい医用材料およびその製造法を提供することにある。

かかる本発明の目的は以下の構成によって達成される。

- 1) 架橋構造を有するコラーゲンを水の存在下で加熱処理した変性コラーゲンからなる細胞侵入性医用材料。
- 2) コラーゲンが再構成された線維化コラーゲンである1項の医用材料。
- 3) 線維化コラーゲンが線維化アテロコラーゲンである2項の医用材料。
- 4) コラーゲンを加熱処理または架橋剤で処理して架橋構造を有するコラーゲンを調製し、次いでこれを水の存在下で50～125℃で加熱することを特徴とする1項の細胞侵入性医用材料の製造法。

本発明の変性コラーゲンは、牛真皮由来のコラーゲンを酸またはアルカリ処理し、得られた三重鎖ヘリックスを有するコラーゲンを加熱処理ま

— 5 —

— 4 —

たは架橋剤で処理し、次いで水の存在下で50～125℃で加熱することによって得られる。原料コラーゲンは、酸またはアルカリ処理したコラーゲンをさらにプロクターゼまたはペプシンによりその分子末端のテロペプチドを消化除去し、抗原性を無くしたものが好ましい。

コラーゲンの架橋は、常法に従ってコラーゲンを加熱処理するか架橋剤で処理することによって実施される。

加熱処理による場合は、コラーゲンを真空中で110℃に24時間以上保持して脱水するのが望ましい。

架橋剤で処理する場合は、架橋剤には特に制限はなく、グルタルアルデヒドのようなアルデヒド系架橋剤、ヘキサメチレンジイソシアネートのようなイソシアネート系架橋剤、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩のようなカルボジイミド系架橋剤等が使用される。

架橋度が低すぎると医用材料としての十分な物

— 6 —

## 特開平 1-230365(3)

理的強度が得られず、逆に高すぎるとコラーゲンの構造・性質が損われるので避けるべきである。0.01~5% (v/v)、好ましくは1~3% (v/v) 架橋剤濃度で架橋させると適当な架橋度のコラーゲンが得られる。

架橋が導入されるべきコラーゲンは、三重鎖ヘリックスを有する分散状の水溶性のものでは架橋しても物性があまり向上しないので、分散状コラーゲンを37℃でりん酸系の緩衝液を用いて中和処理し、生体内にあるような周期性線維構造をもつ再構成された線維化コラーゲンの形にすることが好ましい。これにより架橋処理との相乗効果で物性が飛躍的に向上する。

架橋を導入されたコラーゲンはさらに水の存在下で50~125℃好ましくは90~121℃で20分~1時間加熱される。

本発明の変性コラーゲンはコラーゲンの架橋の前または後に適当な形態に成型される。例えばコラーゲン水溶液から、ソルベントキャスト法によりフィルムをあるいは凍結乾燥法により多孔性ス

ポンジを作製し、次いでこれを加熱処理または架橋剤処理する。あるいはコラーゲン水溶液に架橋剤を加えて架橋し、ゲルを形成させ次いで成型される。

本発明の変性コラーゲンは部分的にコラーゲン分子鎖が変性しているため物性の安定性と細胞侵入性の両方の性質を具備していると思われる。コラーゲンの変性度はヘリックス構造の含量によって示される。ヘリックス含量とは、コラーゲン特有の三重鎖ヘリックスの含量を意味し、変性コラーゲンではこのヘリックスがランダムコイル化しているためヘリックス含量が変性度に対応する。このヘリックス含量は円偏光2色性分光計(CD)や赤外分光光度計(IR)で測定することができ(P. L. Gordon et al.; *Macromolecules*, 1 (8) 954 (1974))。本発明の変性コラーゲンのヘリックス含量は0~80%であり、より好ましくは40~70%である。

以下に実施例および試験例を示して本発明をさらに具体的に説明する。

- 7 -

## 実施例 1

アテロコラーゲン 1.0グラムをpH3.0の希塩酸に溶解して、0.3% (v/v) の溶液を調整する。この溶液を4℃の恒温槽に入れ攪拌しながら、りん酸緩衝液を加え、終濃度が、0.1% (v/v) アテロコラーゲン、30mMりん酸・2・ナトリウム、100 mM NaClであるコラーゲン溶液を調製した。次いで、37℃の恒温槽に1日浸漬し、線維化アテロコラーゲン液を得た。この液を遠心分離(5000r.p.m., 10分)して、濃縮し、0.3% (v/v) 線維化アテロコラーゲン溶液を調製した。この溶液を-30℃で急速凍結した後、凍結乾燥をおこないスポンジを作製した。このスポンジを1% (v/v) ヘキサメチレン・ジイソシアネートのエタノール溶液に室温で24時間浸漬し、架橋を導入した。未架橋のイソシアネートを水洗除去した後に、このスポンジを蒸留水に浸漬した状態で滅菌瓶を用いて、121℃、30分の加熱処理をおこなった。さらに凍結乾燥後110℃、2時間真空下で加熱滅菌して医用材料を得た。

- 9 -

- 8 -

## 実施例 2

実施例1と同様に調製し、架橋を導入したスポンジを蒸留水に浸漬し90℃、30分の加熱処理をおこなった。さらに、凍結乾燥後110℃、2時間真空下で加熱滅菌して医用材料を得た。

## 比較例 1

実施例1と同様に調製し、架橋を導入したスポンジを蒸留水に浸漬し、40℃、30分の加熱処理をおこなった。さらに、凍結乾燥後110℃、2時間真空下で加熱滅菌して医用材料を得た。

## 比較例 2

実施例1と同様に調製し、架橋を導入したスポンジを110℃、2時間真空下で加熱滅菌して医用材料を得た。

## 試験例 1

## 各種医用材料の皮下埋入実験

実施例1、2および比較例1、2で得られたスポンジについて組織適合性をみる一つの指標としてラットの皮下埋入試験をおこなった。試験は、ラットの背に約1.5cmの切り込みをつくり、

- 10 -

特開平 1-230365(4)

1 cm × 1 cm × 1.5 mm の寸法の実施例 1、2 および比較例 1、2 で得られたスポンジをこの切り込みにより作られた空隙に挿入し、傷口を縫合糸で閉じ、移植後 7 日、14 日目に動物を犠死せしめ背筋上の皮膚組織を切り出し、通常の組織切片標本作製法に従いスポンジへの細胞侵入性について、観察をおこなった。結果を表 1 に示す。表 1 から明らかなように、水分存在下での加熱処理により、細胞侵入性の著しい向上が認められた。

(以下余白)

表 1 スポンジへの細胞侵入性

試料	7 日間所見	14 日間所見
実施例 1	好中球と単核細胞の スポンジ内部への侵入認め 同 上	肉芽形成 細胞浸潤認め 同 上
実施例 2	同 上	同 上
比較例 1	細胞侵入ほとんどなし 軽度の被包形成あり 同 上	スポンジ内部への侵入認めず スポンジ周囲は強固な結合組織により被包化 同 上
比較例 2	同 上	同 上

- 11 -

## 試験例 2

## 医用材料の酵素による分解

実施例 1、2 および比較例 1 および 2 で得られた各スポンジを 100 unit/ml の細菌由来コラーゲナーゼ溶液中に 37℃ で 24 時間インキュベートした。その後経時的に溶液中に溶出したコラーゲンのハイドロキシプロリン量を測定し、初期のコラーゲンのハイドロキシプロリン量との比により分解性(%)を算出した。結果を表 2 に示す。

表 2 スポンジの酵素による分解

試料	コラーゲン溶解量(%)	
	3 日目	7 日目
実施例 1	2	7
実施例 2	1	5
比較例 1	0	3
比較例 2	0	4

表 2 から本発明の医用材料は、比較例とほぼ同等の酵素抵抗性を有していることがわかる。

## [発明の効果]

本発明の医用材料は、架橋構造を有するコラー

ゲンを水の存在下で加熱処理した変性コラーゲンからなるため、生体内に埋入あるいは創傷面に被覆された際に、コラーゲナーゼに対して抵抗性を有し、一定期間、必要とされる機械的強度を保持することができるとともに、生体適合性に優れその内部に増殖した細胞が容易に入り込むことができる。アテロコラーゲンを原料として得られる医用材料は抗原性を有しないので、特に望ましい。かかる本発明の医用材料は例えば生体内留置人工心臓、人工血管等や深度熱傷時の人工被覆材として好適に利用される。

本発明はさらに上記医用材料の好適な製造法を提供する。即ちコラーゲンを加熱処理または架橋剤で処理して架橋構造を有するコラーゲンを調製し、次いでこれを水の存在下で 50~125℃ で加熱することによって本発明の細胞侵入性医用材料を簡便に製造することができる。

特許出願人 テルモ株式会社

代理人 弁理士 高木千雄

(外 2 名)



- 13 -

-408-

- 14 -

## 特許法第 1 7 条の 2 の規定による補正の掲載

平 3. 6. 25 発行

昭和 63 年特許願第 53836 号 (特開平  
1-230365 号, 平成 1 年 9 月 13 日  
発行 公開特許公報 1-2304 号掲載) につ  
いては特許法第 1 7 条の 2 の規定による補正があっ  
たので下記のとおり掲載する。 1 ( 2 )

Int. Cl. <sup>1</sup>	識別 記号	庁内整理番号
A 61 L 27/00		C-6971-4C Q-6971-4C

平成 3. 6. 25 発行

手続補正 (自発)

平成 3 年 3 月 1 日

特許庁長官 植 松 敏 殿



## 1. 事件の表示

昭和 63 年特許願第 53836 号

## 2. 発明の名称

細胞侵入性医用材料およびその製造法

## 3. 補正をする者

事件との関係

特許出願人

住所 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 4 番 1 号

名称 テルモ株式会社

代表取締役 戸 澤 三 雄

電話 0465(81)4171(特許部)



## 4. 補正命令の日付

自発

## 5. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

## 6. 補正の内容

(1) 明細書の第 4 頁第 8 行目の「経過」を、「静置」に補正する。

(2) 明細書の第 1 1 頁第 4 行目の「犠死せしめ」を、「屠殺し」に補正する。

以上